

Evaluación del crecimiento de *Lentinula edodes* en medios de cultivo sólidos para la producción de micelio como inóculo

Growth evaluation of *Lentinula edodes* in solid medium cultures for mycelium production as inoculum

Valeska Villegas E¹, Ana Milena Pérez², Clara Arredondo³

Resumen

El crecimiento de la cepa jumbo de *Lentinula edodes* Pegler se evaluó en diferentes medios agarizados y en diferentes sustratos de crecimiento para la formación de "semilla". El crecimiento del micelio se valoró en tres medios de cultivo (MYA, OMYA, PDYA), en dos pH diferentes (5 y 5,5), y en dos porcentajes de aserrín de eucalipto (0,3 y 0,2%), hallándose diferencias significativas en el crecimiento radial en los medios de cultivos ($P < 0,05$) mas no en el pH y el porcentaje de aserrín. La obtención de semilla se evaluó con la técnica de inoculación líquida en cinco diferentes combinaciones de viruta de eucalipto y semillas de trigo, hallando diferencias significativas entre los tratamientos, y arrojando como mejor combinación 80% trigo y 20% viruta de eucalipto.

Palabras clave: *Lentinula edodes*, shiitake, "semilla", crecimiento de micelio.

Abstract

Shitake (*Lentinula edodes*) Pegler jumbo strain growth was evaluated in different solid mediums and growth substrates for spawn production. Mycelium growth was tested in three culture mediums (MYA, OMYA, PDYA) at two pHs (5, 5.5), using two eucalyptus sawdust percentages (0.3%, 0.2%). Analysing variance revealed significant differences in culture medium ($P < 0.05$) but not in pH or percentage of sawdust used ($P > 0.05$). The liquid inoculation technique was used for evaluating mushroom spawn production using five different combinations of eucalyptus sawdust and wheat grain, finding significant differences between treatments, the best combination for shiitake growth being 80% wheat grain and 20% eucalyptus sawdust.

Key words: *Lentinula edodes*, shiitake, spawn, mycelium growth.

Recibido: Enero 25 de 2007 Aceptado: Octubre 5 de 2007

- 1 M.Sc. Docente Universidad EAFIT, Departamento de Ingeniería de Procesos, Carrera 49 - 7 Sur 50 Medellín, Colombia. vvilleg2@eafit.edu.co
- 2 Estudiante de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia. amilenaperez@eafit.edu.co
- 3 Estudiante de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia. clarita.arredondo@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La producción de shiitake (*L. edodes*) se incrementa mundialmente por sus altos valores nutricionales y medicinales. Estados Unidos ha incrementado la producción de este macromiceto de 1 a 8,6 millones de libras entre 1986 y 2000, y su precio ha disminuido de \$5,42 a \$3,29 por libra (Royse, 2001). El incremento de la producción se debe en parte al incremento de las eficiencias de producción y al de la demanda. En Colombia, el consumo y la producción de shiitake, aunque es poco, ha ido incrementándose en los últimos años y se espera un mayor crecimiento con los nuevos tratados de libre comercio (TLC).

Un factor de gran importancia en el cultivo de macromicetos en bloques sintéticos es la optimización de cada una de sus etapas de producción, lo que conlleva una reducción de costos y una mayor competitividad en el mercado. Algunos parámetros influyen en la productividad del sistema: el tiempo de corrida para la producción de “semilla”, el genotipo y la formulación del sustrato (Royse y Bahler, 1986; Royse, 1985). Royse y Bahler en 1986 evaluaron la eficiencia biológica (EB) y el tamaño de los hongos cultivados en dos formulaciones de salvado de trigo, aserrín y mijo con tiempos de corrida de 60, 90 y 120 días, y tres genotipos de *L. edodes* observando interacciones significativas entre genotipo-formulación-tiempo de corrida, encontrando una mayor eficiencia biológica con un mayor tiempo de corrida. Muchas investigaciones se han centrado en aumentar la eficiencia biológica y los rendimientos de producción en shiitake pero a nivel de bloques sintéticos (Royse y Bahler, 1986; Royse *et ál*, 1990; Royse y Vázquez, 2001; Shoji, 1999; López *et ál*, 2001; Kawai *et ál*, 1996), pero muy pocos se han centrado en investigar aquellos procesos anteriores al proceso de fructificación del hongo.

Existen algunos estudios a nivel de crecimiento del micelio en agar. Entre ellos se encuentra el realizado por Shoji (1999) en el cual se evaluó el efecto del potencial osmótico del agua en el crecimiento vegetativo de tres genotipos de *L. edodes* en MYPa (agar malta levadura peptona). El micelio creció

apropiadamente en el medio de cultivo con un potencial de -0,5 MPa (55% humedad). Existen otros estudios como el de Kawai *et ál*, (1996), el cual evalúa la producción de “semilla” líquida con respecto a la “semilla” sólida. En éste se logró obtener una reducción en el tiempo de cosecha de 120 días para la “semilla” sólida a 90 días para la “semilla” líquida.

El objetivo de este estudio es evaluar el crecimiento del micelio de *L. edodes* en diversos medios sólidos con diferentes condiciones de pH y porcentajes de aserrín de eucalipto; y evaluar el crecimiento del micelio para la obtención de “semilla” en diferentes proporciones de semilla de trigo y viruta de eucalipto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo. La cepa jumbo de *Lentinula edodes* Pegler, perteneciente a la colección de Fungi Perfecti® LLC de Estados Unidos, se conservó a temperatura ambiente en aceite mineral. La cepa fue repicada en agar extracto de malta (MA) (Oxoid) a pH 5,5 y se conservó a temperatura ambiente por 15 días.

Reactivos y materiales. Para el crecimiento del micelio de *L. edodes* en caja de Petri se utilizaron los medios agar levadura extracto de malta y avena (OMYA), agar levadura extracto de malta (MYA), agar levadura papa dextrosa (PDYA) (Staments, 2000), y OMYA modificado. Los ingredientes de cada medio fueron: 80 g de avena instantánea marca Éxito, 20 g de agar agar (Merck), 10 g de extracto de malta (Oxoid), 2 g de extracto de levadura (Oxoid) en 1000 ml de agua para OMYA; y 20 g de agar agar, 20 g de extracto de malta (Oxoid), 2 g de extracto de levadura (Oxoid), 1 g de peptona en 1000 ml de agua para MYA; 39 g/l PDA (Merk) + 1,8 g/l de levadura para PDYA; y 40 g/l de avena instantánea, 20 g de agar agar (Merck), 10 g extracto de malta (Oxoid), 2 g de extracto de levadura (Oxoid) en 1000 ml para OMYA modificado. Todos los medios fueron esterilizados en una autoclave tipo horizontal Eastern Modelo EA 620T por 20 min a 121 °C y 15 psig.

Los sustratos utilizados para la obtención de "semilla" fueron viruta de eucalipto obtenida en un aserrío de Rionegro, Antioquia, y semilla de trigo obtenida en Distribuidora Tenerife en Antioquia, Colombia. Ambos sustratos fueron hervidos durante 15 minutos en agua para liberar impurezas, y se realizaron varios enjuagues con agua. El tiempo de remojo para la viruta de eucalipto y las semillas de trigo fue de 12 y 2 h respectivamente con el fin de humedecerlos. Después se mezclaron en diferentes proporciones según el diseño de experimentos con una humedad final del $50 \pm 3\%$ determinada en una balanza Sartorius MA45.

Crecimiento en agar. La cepa de generación uno de *L. edodes*, contenida en MA a pH 5,5, fue seccionada en cuadrantes de 1 cm^2 y transferida al centro de las cajas de Petri de los 18 tratamientos obtenidos del diseño de experimentos, conservada a $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Los factores evaluados fueron el tipo de medio de cultivo (OMYA, MYA, y PDYA), el porcentaje de aserrín de eucalipto (0,2 y 0,3%) y el pH (5, y 5,5). La medición del crecimiento radial en las cajas de Petri de 9 cm se realizó cada dos días por medio de la medición del diámetro hasta lograr una colonización total del área de siembra (14 días). Los experimentos fueron diseñados en bloques al azar con un arreglo factorial de 3 réplicas cada uno.

Dicho experimento se repitió pero solo con los medios OMYA modificado y MYA a pH de 5,5 con aserrín de eucalipto al 0,3%, y sin aserrín. En todos los ensayos se realizaron controles negativos sin presencia de *L. edodes* con el fin de identificar posible contaminación por otros microorganismos.

Obtención de semilla. La obtención de "semilla" se realizó por medio de la técnica de inoculación líquida (Staments, 2000; Kawai *et al.*, 1996). El medio de cultivo para la fermentación contenía 40 g de extracto de malta (Oxoid), 2 g de extracto de levadura (Oxoid), 1 g de sulfato de calcio, y 3 g de aserrín de eucalipto en 1000 ml de agua (Staments, 2000). El crecimiento micelial se llevó a cabo en erlenmeyers de 500 ml con 200 ml de medio de cultivo, se inocularon 2 cuadrantes de 1 cm^2 del micelio de 15 días

de cultivado en MYA (pH 5,0 y 0,3% aserrín), se agitó a 100 rpm por 72 h en un agitador orbital. Se utilizaron 15 ml de inóculo por cada 250 g de "semilla" usada (Staments, 2000; Yang y Jong, 1987).

El diseño experimental utilizado para la obtención del "semilla" consistió en variar el porcentaje de semilla de trigo (T) y viruta de eucalipto (E) como se muestra en la tabla 1. El sustrato fue colocado en frascos de 500 ml y se esterizaron en una autoclave tipo horizontal Eastern Modelo EA 620T por 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 15 psig. Las muestras de semilla fueron agitadas en el momento de adicionar el inóculo y mantenidas a $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 días. El experimento fue diseñado en bloques al azar con tres réplicas por tratamiento.

Tabla 1. Tratamientos para la obtención de "semilla" de *L. edodes*

Viruta de eucalipto (%)	Trigo (%)
100	0
50	50
80	20
20	80
0	100

La evaluación del crecimiento del micelio se realizó de manera cualitativa, determinando el tiempo necesario para colonizar todo el frasco. Para precisar la calidad del micelio se realizó una observación cualitativa determinando la colonización del grano en la superficie del frasco. La calificación fue la siguiente:

1-2: micelio poco denso (0-30% del grano cubierto por micelio).

2-3: micelio medianamente denso (30-80% del grano cubierto por micelio).

3-5: micelio denso (80-100% del grano cubierto por micelio).

Adicionalmente, se determinó en el tiempo el porcentaje del frasco colonizado por el micelio.

En todos los ensayos se realizaron controles negativos sin presencia de *L. edodes* con el fin de identificar posible contaminación por otros microorganismos.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis multifactorial de varianza (Anova) con el 95% de confianza en Startgraphics Plus 5,0 para el diseño de experimentos del crecimiento de *L. edodes* en agar. Los factores considerados fueron medio de cultivo, pH y porcentaje de aserrín de eucalipto, utilizando como variable dependiente el diámetro en centímetros. Adicionalmente se analizaron las posibles interacciones entre los factores. El valor F en la tabla Anova permitió identificar los factores significativos, y para cada factor el examen de rango múltiple permitió identificar para

cada media cuáles son significativamente diferentes entre ellos.

El análisis de varianza para la obtención de "semilla" fue unifactorial, utilizando como factor el medio de cultivo y como variable dependiente el porcentaje de colonización o la densidad cualitativa del micelio. El valor F en la tabla Anova permitió identificar los efectos significativos sobre la variable de respuesta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento en agar. El micelio de *L. edodes* creció en todos los medios de cultivo, pH y porcentajes de aserrín de eucalipto evaluados, alcanzando un diámetro de 9 cm en aproximadamente 14 días (figura 1). Adicionalmente, el micelio poseía una característica algodonosa de color blanco y la cepa jumbo desarrolló agregados de hifas suaves con una estructura similar a esferas pequeñas especialmente en el medio de cultivo OMYA. Después de transcurridos varios días,

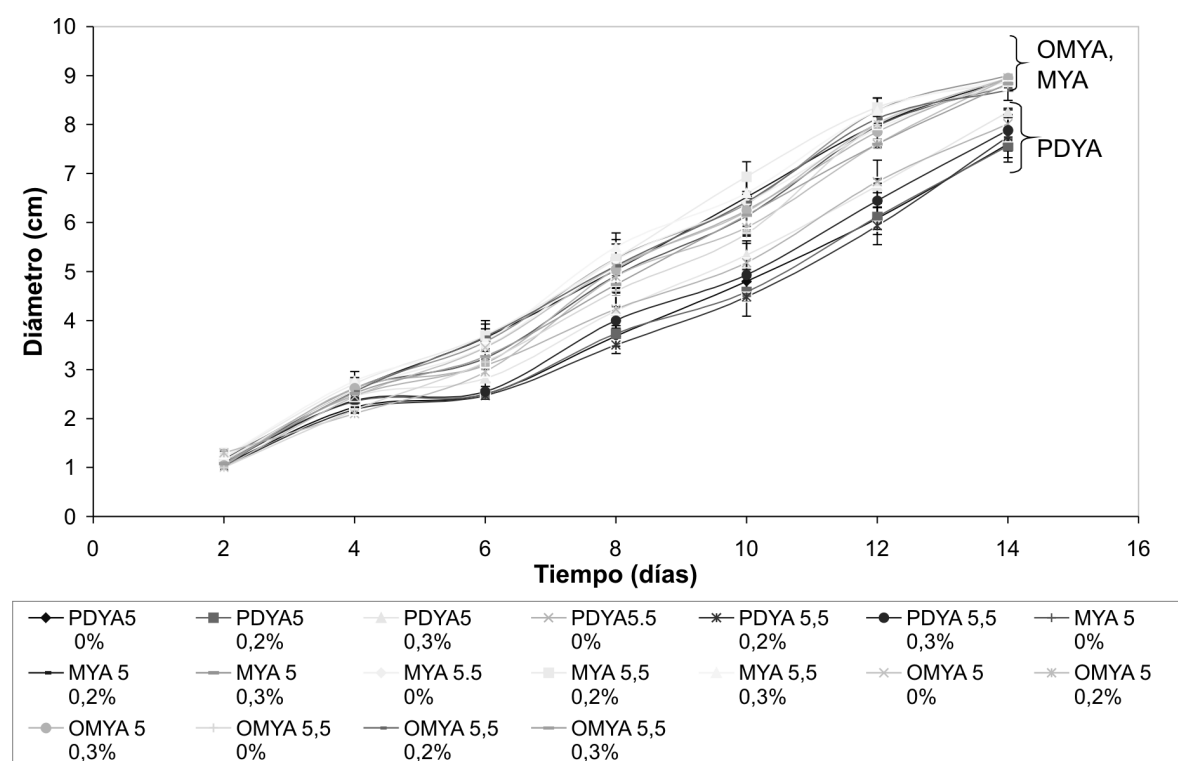


Figura 1. Crecimiento de micelio de *L. edodes* en diferentes medios de cultivo sólidos agarizados. Barras verticales: error estándar.

algunos sectores del micelio se tornaron cafés indicando maduración (Staments, 2001). Ningún control negativo presentó contaminación.

Cualitativamente se pudo observar un micelio más fuerte y vigoroso en el medio de cultivo OMYA sin importar el pH y el porcentaje de aserrín utilizado. Dicho micelio logró ocupar toda la caja incluyendo su parte superior (figura 2a), mientras que en los otros medios de cultivo el micelio solo colonizaba el medio sin extenderse hacia arriba (figura 2b).

El análisis de varianza reportó un valor $P = 0,007$ para el factor medio de cultivo, siendo los medios MYA y OMYA significativamente diferentes al medio PDYA con respecto al diámetro colonizado, con un nivel de confianza del 95%. Adicionalmente, existe una interacción entre los dos parámetros evaluados (pH y medio agarizado) obteniendo un mejor resultado para pH = 5,5 en MYA; sin embargo, las diferencias no son significativas entre ellas ($p = 0,98$).

El medio de cultivo OMYA fue de difícil manejo. La avena instantánea proporcionaba

una viscosidad muy alta y, por ende, muchas probabilidades de contaminación al momento de vaciarlo en las cajas de Petri. Por este motivo se realizó un nuevo experimento con un medio OMYA modificado, el cual contenía 40 g/l de avena instantánea. El experimento se llevó a cabo para comparar el medio OMYA modificado con MYA a pH = 5,5, con aserrín de eucalipto al 0,3%, y sin aserrín. El análisis de varianza, con un porcentaje de confiabilidad del 95%, arrojó un valor $p > 0,05$ para ambos factores (medio y porcentaje de aserrín) indicando que no existen diferencias significativas para estos factores con relación con el crecimiento radial del micelio en el tiempo.

Todos los medios de cultivo evaluados poseen nutrientes que permitieron crecimientos de diferente magnitud para el micelio de *L. edodes*. Se puede concluir que los medios MYA y OMYA (agar malta levadura) son los que proporcionan un crecimiento más rápido del micelio de siembra, probablemente por su alto contenido de nitrógeno total aportado por el extracto de malta, la levadura y

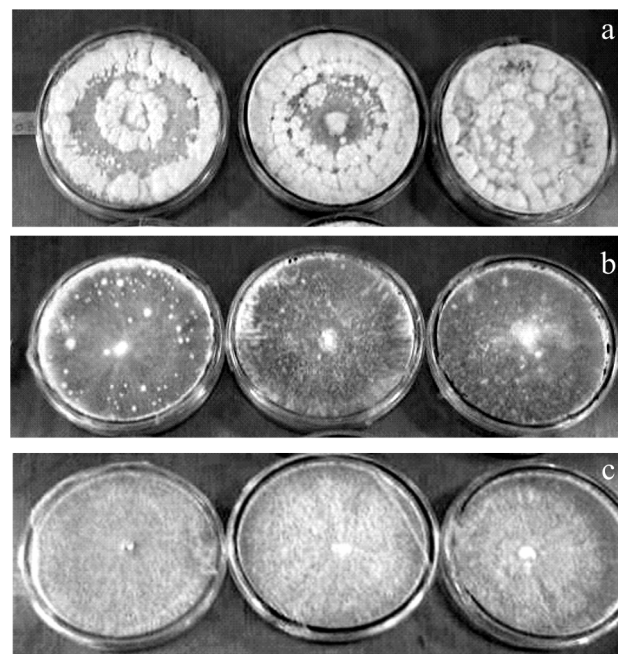


Figura 2. Crecimiento del micelio en medios sólidos agarizados. a) OMYA, pH 5,5 y 0,3% aserrín de eucalipto; b) MYA, pH 5,0 y 0,2% aserrín de eucalipto; c) PDYA, pH 5,0 y 0,0% aserrín de eucalipto.

la avena. La gran diferencia en la densidad del micelio obtenida en el medio OMYA con relación al MYA puede deberse al contenido de avena. Los cereales son una fuente rica en proteínas y calorías. Mertz (1975) reportó que la base de aminoácidos en la avena es la mejor de todos los granos de cereal, con un porcentaje aproximado de lisina del 70% del ideal. La concentración de proteína de la avena varía de un 10,25% a un 15,69% en peso seco, y la grasa de un 5,7% a un 10,41%, y un porcentaje bajo de cenizas y taninos (Eggum y Guillord, 1983). Adicionalmente, estos extractos poseen altos contenidos de azúcares complejos (carbohidratos y polisacáridos), vitaminas, minerales y sales que son esenciales para el crecimiento saludable del micelio.

En la literatura se encuentran algunas referencias sobre el crecimiento micelial de ciertos hongos en medios de cultivo agarizados (Essien *et ál*, 2005; Stecchini *et ál*, 2001; Fravel *et ál*, 2005); sin embargo, no se hallan estudios reportados en la literatura con *L. edodes*. Uno de estos estudios evaluó el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y *Mucor hiemalis* in vitro a temperatura ambiente en un medio de cultivo agarizado con cáscara de banano (BPA), y en caldo de cáscara de banano (BPB). Ambos microorganismos crecieron en los dos sustratos, y no se hallaron diferencias significativas en el crecimiento radial de ambos microorganismos en BPA y MEA (agar extracto de malta) (Essien *et ál*, 2005).

L. edodes produce grandes cantidades de hidrolasas y oxidasas para la bioconversión de desechos lignocelulíticos (Hatvani y Mécs, 2001; Milagres *et ál*, 2005), y la diferencia entre las actividades enzimáticas de diferentes cepas de *L. edodes* puede generar información útil para el desarrollo de cuerpos fructíferos, en especial la lacasa y la celulasa (Ohga y Royse, 2001). La actividad de la lacasa en las etapas tempranas de la colonización fue relacionada con la degradación de compuestos fenólicos presentes en la cebada de trigo, y la actividad de la enzima manganeso peroxidasa se relacionó con el crecimiento micelial por Mata y Sovoie 1998.

Los resultados reportados por Milagres *et ál*, (2005) indicaron que la producción extracelular de enzimas, y la formación de biomasa micelial de diferentes cepas de *L. edodes* fue ideal en residuos de eucalipto mezclado con salvado de arroz, lo que puede indicar que la presencia de eucalipto en los medios de cultivo sólidos utilizados en el presente trabajo posiblemente generan una respuesta en las enzimas lignocelulíticas necesarias para la producción posterior del cuerpo fructífero del shiitake. Aunque no se encuentran diferencias significativas en el crecimiento radial del micelio con relación al porcentaje de aserrín de eucalipto, se recomienda cultivar con un 0,2 a 0,3% de éste.

Obtención de "semilla". El micelio de *L. edodes* creció en todas las combinaciones de sustratos de trigo y viruta de eucalipto; sin embargo, la calidad y vigorosidad fue muy diferente en cada uno de ellos. El micelio colonizó todo el frasco a los 15 días en los medios 100% trigo, y 80% semillas de trigo 20% viruta de eucalipto.

En la figura 3 se pueden observar los resultados del desarrollo del micelio en los diferentes medios de cultivo. Al realizar un análisis de varianza (Anova) con un 95% de confianza para la calidad del micelio para el tiempo de 17 días, se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos, arrojando como mejor resultado el tratamiento con 80% trigo – 20% viruta de eucalipto. Ningún control negativo reportó signos de contaminación.

La semilla de trigo es un suplemento que proporciona un alto contenido de carbohidratos y proteínas, y por ende un mejor crecimiento del micelio. Boyle (1998) evaluó el crecimiento de *L. edodes* en maderas suplementadas con diferentes nutrientes, hallando que la velocidad de crecimiento del micelio no era limitada por la disponibilidad de carbohidratos, y que muchos suplementos que contenían nitrógeno lo incrementaban sin inhibir la degradación de la lignina. Varios autores han reportado que las fuentes de nitrógeno inhiben la degradación de la lignina por muchos hongos (Eriksson *et ál*, 1990; Boyle *et ál*, 1992), pero *L. edodes* y *P.*

ostreatus se han identificado como excepciones (Leatham y Kira, 1983; Boyle, 1998). Es entonces de esperar que el suplemento de trigo no afecte la degradabilidad de la lignina del eucalipto, y que su crecimiento aumente en presencia de semillas de trigo.

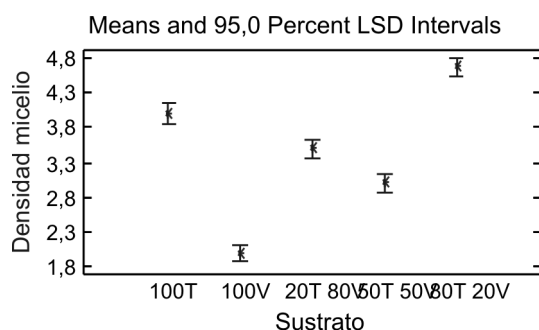


Figura 3. Crecimiento del micelio de *L. edodes* en diferentes combinaciones de sustrato (T: trigo, V: viruta de eucalipto) en el tiempo de 17 días. 1 a 2: micelio poco denso, 2 a 3 micelio medianamente denso, 3 a 5: micelio denso.

CONCLUSIONES

El micelio de la cepa Jumbo de *L. edodes* crece más rápidamente en los medios sólidos MYA y OMYA que en PDYA con presencia o ausencia de aserrín de eucalipto, y en pH de 5 o 5,5. Se recomienda utilizar MYA a pH 5,5 y 0,3% de aserrín de eucalipto por sus buenos resultados en el crecimiento y su fácil manipulación.

Si se desea trabajar con el medio OMYA se recomienda utilizar el OMYA modificado ya que éste solo contiene 40 g/l de avena, la mitad de la avena contenida en el medio original. Además, la vigorosidad del micelio en el OMYA es mayor a la del medio MYA.

Aunque no se encuentran diferencias significativas entre 100% trigo y 80% trigo – 20% viruta de eucalipto, se recomienda obtener la “semilla” con esta última combinación para activar las enzimas lignocelulíticas del hongo necesarias para la producción del cuerpo fructífero del hongo.

Se recomienda realizar estos mismos ensayos con otras cepas de *L. edodes*, con el

fin de comprobar el efecto de los diferentes medios de cultivo y del pH en el crecimiento micelial del hongo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad EA-FIT, financiadora del proyecto de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boyle, C. D., Kropp, B.R., Reid, I.D. 1992. Solubilization and mineralization of lignin by white-rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3217-3224.
- Boyle, D. 1998. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. *Soil Biol. Biochem*, 30: 817-823.
- Eggum, B. O, Guillard, M. 1983. The nutritional quality of some oat varieties cultivated in Norway. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 32: 67-73.
- Eriksson, K. E. L., Blanchette, R. A., Ander, P. 1990. *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. New York: Springer-Verlag, pp. 89-180.
- Essien, J. P., Akpan, E. J., Essien, E. P. 2005. Studies on mould growth and biomass production using waste banana peel. *Bioresource Technology*, 96: 1451-1456.
- Fravel, D. R., Deahl, K. L., Stommel, J. R. 2005. Compatibility of the biocontrol fungus *Fusarium oxysporum* strain CS-20 with selected fungicides *Biological Control*, 34: 165-169.
- Hatvani, N., Mécs, I. 2001. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinula edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. *Process Biochem*, 37: 491-6.
- Kawai, G., Koboyashi, H., Fukumisha, Y., Ohsaki, K. 1996. Effect of liquid mycelial culture used as spawn on sawdust cultivation of shiitake (*Lentinula edodes*). *Mycoscience*, 37: 201-207.
- Leatham, G. F., Kira, T. K. 1983. Regulation of lignolytic activity by nutrient nitrogen in white-

- rot basidiomycetes. FEMS Microbiological letters, 16: 65-67.
- Leatham, G., Stahlman, M. A., 1987. Efecto of light and aeration on fruiting of *Lentinula edodes*. Transactions of the British Mycological Society, 88: 9-20.
- López - Jaramillo, C., Valencia - Rodríguez, N. 2001. Cultivo de Shiitake en subproductos del café. Avances Técnicos Cenicafe, 287. pp. 1-4.
- Mata, G., Savoie, J. M. 1998. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14: 513-519.
- Mertz, E. T. 1975. Breeding for improved nutritional value in cereals. Friedman, Mendel (eds.) Protein nutritional quality of foods and feeds, vol 2. New York: M Dekker, pp. 1-12.
- Milagres, A. M. F, Silva, E. M., Machucab, A. 2005. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. Process Biochemistry, 40 (1): 161-164.
- Ohga, S., Royse, D. J. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. FEMS Microbiol Lett., 201: 111-15.
- Raaska, L. 1990. Production of *Lentinula edodes* mycelia in liquid media: Improvement of mycelial growth by medium modification. Mushroom Journal of the Tropics, 10: 79-92.
- Royse, D. J. 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. Mycologia, 77: 756-762.
- Royse, D. J. 2001. Cultivation of Shiitake on Natural and Synthetic Blocks. Publications Distribution Center. Penn State University. Disponible en: <http://pubs.cas.psu.edu/FreePubs/pdfs/ul203.pdf>
- Royse, D. J., Bahler, C. C. 1986. Effects of genotype, spawn run time, and substrate formulation on biological efficiency of shiitake. Appl. Environ. Microbiol, 52: 1425-1427.
- Royse, D. J., Bahler, B. D, Bahler, C. C. 1990. Enhanced Yield of Shiitake by Saccharide Amendment of Synthetic Substrate. Applied and Environmental Microbiology. pp. 479-482.
- Royse, D. J., Sánchez-Vázquez, J. E. 2001. Influence of substrate wood – chip particule size on shiitake (*Lentinula edodes*) yield. Bioresource Technology, 76: 229-233.
- Royse, D. J., Sánchez-Vázquez, J. E. 2003. Influence of precipitated calcium carbonate (CaCO₃) on shiitake (*Lentinula edodes*) yield and mushroom size. Bioresource Technology, 90: 225-228.
- Shoji, O. 1999. Effect of water potencial on fruit body formation of *Lentinula edodes* in sawdust – based substrate. J. Wood Sci, 45: 337-342.
- Staments, P. 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Ten Speed Press, pp. 85-86, 259-275.
- Stecchini, M. L., Del Torre, M., Donda, S., Maltini, E., Pacor, S. 2001. Influence of agar content on the growth parameters of *Bacillus cereus*. International Journal of Food Microbiology 64: 81-88.
- Yang, Q. Y., Jong, S. C. 1987. A quick and efficient method of making mushroom spawn. Mushroom Science XII. pp. 317-324.